

# Transient expression of plant specific domain of potato aspartic proteases (StAP-PSI) restricts *P. infestans* spread in potato leaves.

Ma. Eugenia Frey <sup>1</sup>, Alfonso Pepe <sup>1</sup>, Gustavo R. Daleo <sup>1</sup>, Ma. Gabriela Guevara <sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3250, 4to nivel (7600), Mar del Plata, Argentina

T.E.: 0223-4753030

\*[gguevara@mdp.edu.ar](mailto:gguevara@mdp.edu.ar)

## ABSTRACT

Plant specific insert (PSI) is a domain present in the precursors and mature atypical plant aspartic proteases (APs). Several plant APs have been associated with the plant mechanism of defence against pathogens. However, only two (*StAP1* and *StAP3*, for *Solanum tuberosum* APs) of these proteases, contain the PSI domain into the mature form. We have previously reported the cytotoxic activity of the recombinant *StAP-PSI* towards plant pathogens. However the role of PSI domain of *StAPs* in the plant mechanism defense is still unknown. The aim of this work was to analyze the effect of transient expression of *StAP-PSI* in potato leaves infected by *P. infestans*. Results obtained show that *StAP-PSI* expression reduces the *P. infestans* affected area in a 60 % compared with the control ones. Analysis by qPCR shows an increase of the transcript level of the hypersensitive response marker (*hsr203J*) in potato leaves that express *StAP-PSI*, independent of the *P. infestans* infection; however the highest increase of this gene was detected in leaves at 6 h. after infection. Additionally, an increase of the *WRK11* transcript level was detected in potato leaves that express *StAP-PSI*. Results obtained here indicate that, PSI domain of *StAPs* could have a direct (as antimicrobial compound) and indirect (as an inductor molecule) role in the plant mechanism to restrict the pathogen spread.

**Palabras clave:** interacción planta- patógeno, fitoproteasas, proteínas del tipo saposinas.

## INTRODUCCIÓN

Las aspartil proteasas (APs; EC 3.4.23) comprenden una de las cuatro superfamilias de enzimas proteolíticas las cuales están ampliamente distribuidas entre todos los organismos (Alan J. Barrett, J. Fred Woessner, 2012; Davies, 1990; Dunn, 2002; Rawlings & Barrett, 1999; Simões & Faro, 2004). Específicamente, las APs de plantas se dividen en tres categorías: las APs típicas, las APs de tipo nucelina (del inglés “*nucellin-like*”) y las APs atípicas (Faro & Gal, 2005). Las APs típicas son sintetizadas como preproteínas conteniendo en la región del extremo carboxilo terminal, un dominio de 50 a 100 aminoácidos denominado como inserto específico de plantas (del inglés “*plant specific insert*” PSI) el cual es removido durante la

maduración de la proteína. Este dominio no posee homología con ninguna secuencia descrita para APs de animales o microorganismos, sin embargo posee una alta similitud estructural con proteínas de la familia de las saposinas (SAPLIPs del inglés “*saposin like proteins*”) (Mutlu, Chen, Reddy, & Gal, 1999; Simões & Faro, 2004). Las APs de plantas de tipo nucelina codifican para proteínas similares a la AP de cebada (Chen & Foolad, 1997), mientras que las APs atípicas presentan formas intermedias entre las APs típicas y las APs del tipo nucelina, incluyendo entre otras APs extracelulares monoméricas con o sin la presencia del dominio PSI en su forma madura.

En general las APs, participan en el procesamiento y/o degradación de proteínas en diferentes órganos de las plantas y se las ha relacionado con la senescencia, la muerte celular programada, la reproducción y el mecanismo de defensa de las plantas frente a diferentes situaciones de estrés (Alan J. Barrett, J. Fred Woessner, 2012; García-Lorenzo, Sjödin, Jansson, & Funk, 2006; Guo et al., 2014; Simões & Faro, 2004).

En lo que respecta a la participación de APs durante diferentes tipos de estrés, Cruz de Carvalho y col., (Cruz de Carvalho et al., 2001) detectaron un aumento tanto en el nivel de expresión como en la actividad de APs en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. y de *Vigna unguiculata* L. sometidas a estrés hídrico. Los autores sugieren que dicho incremento en la actividad de APs se debe al rol de estas enzimas en la movilización del nitrógeno hacia los distintos órganos de la planta (Cruz de Carvalho et al., 2001). Se ha observado además la inducción en la actividad proteolítica de APs aisladas de semillas de coliflor que se inducen posteriormente al tratamiento con polietilenglicol, lo cual sugiere un rol de estas proteínas cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico (Fujikura & Karssen, 1995). Adicionalmente, se ha reportado en *A. thaliana* la participación de APs en la respuesta a estrés por sequía, tal es el caso de la AP ASPG1 (ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 1), la cual se sobreexpresa y le confiere a la planta la capacidad de evitar dicho estrés a través de la vía de señalización dependiente de la fitohormona ABA (ácido abscísico) (Yao, Xiong, Ye, & Wu, 2012).

Hasta la actualidad existen pocos ejemplos de aspartil proteasas cuya función ha sido relacionada con el mecanismo de defensa de las plantas frente a la infección por patógenos (M. G. Guevara, Oliva, Huarte, & Daleo, 2002; M. G. Guevara, Veríssimo, Pires, Faro, & Daleo, 2004; María G. Guevara et al., 2005; Prasad, Creissen, Lamb, & Chattoo, 2009, 2010; Rodrigo, Vera, Van Loon, & Conejero, 1991; Xia et al., 2004).

Xia y col., (2004) reportaron en *A. thaliana* una AP atípica monomérica extracelular y sin PSI denominada CDR1 (*Constitutive Disease Resistance 1*) necesaria para la inducción de genes relacionados a patogénesis (PR). Estos autores proponen que la actividad proteolítica de CDR1 liberaría en el apoplasto un péptido de bajo peso molecular que actuaría como una señal móvil capaz de desencadenar la respuesta de defensa en plantas en zonas lejanas al sitio de infección. Adicionalmente, Prasad y col., aislaron y caracterizaron el gen ortólogo de CDR1 en arroz denominado como OsCDR1 (*Oryza sativa Constitutive Disease Resistance 1*), y determinaron que su expresión ectópica, tanto en *A. thaliana* como en arroz, confiere a las plantas una mayor resistencia frente a la infección por bacterias y hongos patógenos (Prasad et al., 2009, 2010). Al igual que CDR1, OsCDR1 es capaz de inducir respuestas de defensa sistémica en las plantas y dicha inducción es dependiente de su actividad proteolítica (Prasad et al., 2010). Recientemente fue reportada la inducción de otra aspartil proteasa de arroz, OsAP77 en respuesta a la infección de virus, bacterias y hongos en el tejido vascular de plantas de arroz, sugiriendo la participación de esta proteasa en la defensa de la planta frente al ataque de patógenos (Alam et al., 2014).

Anteriormente, en nuestro laboratorio, se ha correlacionado el nivel de expresión de dos APs extracelulares de hojas y tubérculos de papa (*StAP1* y *StAP3*) con el nivel de resistencia a campo *P. infestans*. Estas APs de papa son, al igual que CDR1 y OsCDR1, del tipo atípicas, sin embargo en las *StAPs* el dominio PSI persiste en su forma madura confiriéndole a estas enzimas la capacidad de ejercer actividad citotóxica frente a microorganismos patógenos (M. G. Guevara et al., 2002; María G. Guevara et al., 2005; Mendieta, Pagano, Muñoz, Daleo, & Guevara, 2006; Muñoz et al., 2010). Asimismo, resultados obtenidos por Muñoz (Muñoz, 2012) indican que la

presencia de la proteína *StAP3*, tanto en su forma activa como inactiva, ocasiona una disminución del área foliar afectada por *P. infestans* en hojas de papa de un cultivar susceptible, siendo mayor la restricción de la zona de infección en presencia de la *StAP3* activa. Adicionalmente se pudo demostrar que al igual que *OsCDR1* y *CDR1*, *StAP3* es capaz de generar una/s señal/es peptídica/s móvil/es de bajo peso molecular la/s cual/es producen una disminución del área foliar afectada por este patógeno cuando son infiltradas en hojas (Muñoz, 2012). Por otra parte, la actividad proteolítica de *StAP3*, al igual que para *CDR1* y *OsCDR1* (Prasad et al., 2009, 2010; Xia et al., 2004) es requerida para producir una mayor acumulación en los niveles de transcritos de los genes relacionados con HR y/o una señal peptídica móvil para inducir SAR.

Basándonos en los antecedentes anteriormente descritos, el presente estudio consistió en determinar el rol del dominio *StAsp-PSI* en el mecanismo de defensa de hojas de planta de papa frente a la infección por *P. infestans*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** La cepa de *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) fue crecida en medio LB líquido y/o LB agar 1,2%, con el agregado del antibiótico espectinomicina o no, e incubada a 37°C.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Invitrogen) fue crecida en medio LB y/o LB agar 1,2%, con el agregado de los antibióticos e incubada a 30°C durante la noche. Los antibióticos utilizados fueron: rifampicina, que es la resistencia propia de la cepa; y espectinomicina, que es la resistencia otorgada por el plásmido pCHF3.

El aislamiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary raza R2 R3 R6 R7 R9 tipo A2 fue obtenido a partir de la colección Córdoba. El mismo se creció sobre rodajas de tubérculos cv. Spunta a 18°C y 100% de humedad relativa en oscuridad. Cinco días post- inoculación se cosechó el micelio en agua destilada estéril y se estimuló la liberación de zoosporas mediante agitación y posterior incubación en oscuridad a 4°C

durante 3 h. Una vez filtrado, se cuantificaron las esporas y esporangios utilizando un microscopio de campo claro ajustando la concentración a  $10^5$  esporangios/ ml (Pieterse, Derksen, Folders, & Govers, 1994).

Los tubérculos de papa-semilla del cultivar *Bintje* fueron provistos inicialmente por la estación experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Balcarce, Argentina y del cual actualmente el laboratorio cuenta con stock. Las plantas de papa fueron crecidas en una mezcla estéril de tierra y vermiculita (2:1 v/v) y fueron mantenidas a 18°C durante 6 semanas con un fotoperíodo de 14 h/10 h (luz/oscuridad).

**Amplificación por PCR de las regiones correspondientes al péptido señal y al PSI (StAsp-PSI).** Anteriormente, Guevara y col., (2004, 2005) reportaron la localización apoplástica de las StAPs aisladas de hojas y tubérculos de papa. Teniendo en cuenta este antecedente, y con el objetivo de direccionar el dominio StAsp-PSI hacia el espacio extracelular, se decidió construir un ADNc conteniendo la secuencia correspondiente al péptido señal del clon de ADNc de StAsp (*GenBank accession number* AY672651), ligado a la secuencia correspondiente al dominio StAsp-PSI. Para ello, en primer lugar se realizó la amplificación por PCR de las secuencias que codifican para: **1-** el péptido señal de un peso molecular estimado de 72 pb; y **2-** el dominio StAsp-PSI, de un peso molecular estimado de 447 pb. Las regiones del ADNc StAsp1 propuestas para la amplificación por PCR fueron desde el nucleótido 1 al 72 para la amplificación del péptido señal y desde el nucleótido 810 hasta el 1257 para la amplificación del dominio StAsp-PSI. Los primers utilizados para estas amplificaciones fueron: **1-** para el péptido señal: PRO-BamHI *Fw* como *primer forward* (conteniendo el sitio de corte para *BamHI*) y PRO-EcoRI *Rv* como *primer reverse* (conteniendo el sitio de corte para *EcoRI*) y **2-** para el dominio StAsp-PSI: PSI-EcoRI *Fw* como *primer forward* (conteniendo el sitio de corte para *EcoRI*) y como *primer reverse* PSI-PSTI *Rv* (conteniendo el sitio de corte para *PSTI*).

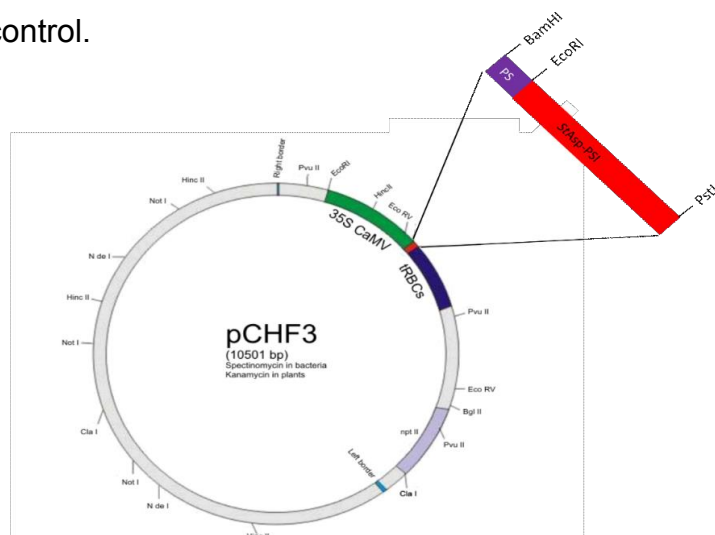
Los productos de amplificación fueron purificados del gel, y sometidos a la digestión enzimática utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. Los productos de la digestión fueron purificados y ligados. Una alícuota de la mezcla de ligación se utilizó como

ADNc templado para una reacción de PCR utilizando como *primer forward* PRO-BamHI Fw (conteniendo el sitio de restricción para *Bam*HI) y como *primer reverse* PSI-PSTI Rv (conteniendo el sitio de restricción para *PST*I).

**Clonado del ADNc StAsp-PSI, transformación y preparación de plásmido.** El producto de amplificación *péptido señal-StAsp-PSI* se purificó del gel y se sometió a una digestión con las enzimas *Bam*HI y *PST*I. Los productos de la digestión fueron purificados y ligados al vector binario pCHF3, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta manera la construcción *péptido señal-StAsp-PSI* de ADNc, quedó bajo control del promotor constitutivo del virus de mosaico de la coliflor (CaMV35S). Posteriormente se transformaron, con este vector, células de *E. coli* DH10B químicamente competentes y se seleccionaron aquellas colonias transformantes por resistencia a la espectinomicina, resistencia otorgada por el vector pCHF3 en bacterias.

A partir de las colonias resistentes obtenidas (transformantes), se purificó el ADN plasmídico mediante minipreparaciones, confirmando por PCR la presencia de la construcción *péptido señal-StAsp-PSI*. Dichas minipreparaciones fueron utilizadas para transformar células de *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90).

**Transformación transitoria de hojas de papa del cultivar Bintje.** Las hojas de planta de papa fueron cortadas e infiltradas con el medio conteniendo *A. tumefaciens*. De esta manera se realizaron 3 o -5 spots de infiltración en el espacio intercelular del envés de cada hoja, infiltrando del lado derecho medio de infiltración conteniendo la construcción *péptido señal-StAsp-PSI* (Figura 1), y del lado izquierdo medio de infiltración conteniendo células de *A. tumefaciens* sin transformar como control.



**Figura 1.** Esquema representativo de la construcción vector pCHF3-péptido señal- StAsp-PSI obtenida.

**Ensayos de infección de hojas con *P. infestans*.** Para la realización de los ensayos de infección con el oomicete *P. infestans*, se utilizaron las hojas agroinfiltradas, las cuales fueron inoculadas por medio de spray con agua estéril (control) o una suspensión de  $10^5$  esporangios/ ml de *P. infestans*. Posteriormente, las hojas tratadas se colocaron en placas de Petri y se las incubó a 18°C y 100% de humedad relativa durante 0, 1, 6, 12, 24, 48, 72 y 144 horas. Finalmente, el área foliar infectada por *P. infestans* se determinó y cuantificó utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de niveles de expresión mediante PCR en tiempo real**

#### **a) Extracción de ARN total.**

El ARN total se extrajo pulverizando las hojas de plantas de papa (cv. *Bintje*) en nitrógeno líquido. Rápidamente se agregó el reactivo TRIzol (Invitrogen), se vortexeó y se centrifugó a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo y luego se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.2ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó por 2- 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 xg por 15 minutos a 4° y se recuperó la fase acuosa superior a la cual se le adicionaron 0.25 ml de isopropanol y 0.25ml de solución de precipitación de alta sal (citrate de sodio 0.8M y NaCl 1.2M). A continuación se mezcló y se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del precipitado con 1ml de etanol 70% y posterior centrifugación a 12000 xg por 5 minutos y 4°C. Se llevó a cabo un lavado adicional con etanol 100%. El ARN obtenido se resuspendió en agua estéril.

#### **b) Síntesis del ADN complementario (ADNc).**

Para la síntesis de ADNc, se incubó 1µg de ARN tratado con ADNasa con 0.25µg de *primer* oligo dT (Biodynamics) en un volumen final de 10µl. Luego se calentó a 70°C por 10 minutos y se incubó a 4°C durante 10 minutos. Brevemente se agregaron buffer de RT (concentración final: 1X), dNTPs en una concentración final de 2,5 mM

cada uno, 200 U de enzima RT M-MLV (Promega) al tubo de reacción y se llevó a un volumen final de 25µl. A continuación, se incubó primero a 37°C por 90 minutos y luego a 70°C durante 15 minutos. Finalmente el ADNc obtenido fue utilizado inmediatamente o guardado a -20°C.

### **c) Amplificación del ADNc mediante PCR en tiempo real.**

La reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Las mezclas de reacción se realizaron colocando 1µl de una dilución 1:5 de ADNc de los distintos tratamientos para los genes EF-1-α, WRKY1, *hsr203J* y *StSBTc-3*, 5µl de la mezcla “Fast Start Universal Sybr Green Master (Rox) 2X” y 0.50µl de la mezcla de *primers* correspondientes. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en una placa de 48 pocillos.

**Análisis estadísticos.** Con el objetivo de determinar el área foliar afectada por la infección por *P. infestans* en hojas de papa agroinfiltradas y para determinar si existen diferencias significativas en los niveles de transcriptos de los diferentes genes, se calcularon los valores P a partir de los datos correspondientes realizando análisis de ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey, utilizando el programa GraphPad Prism 5.

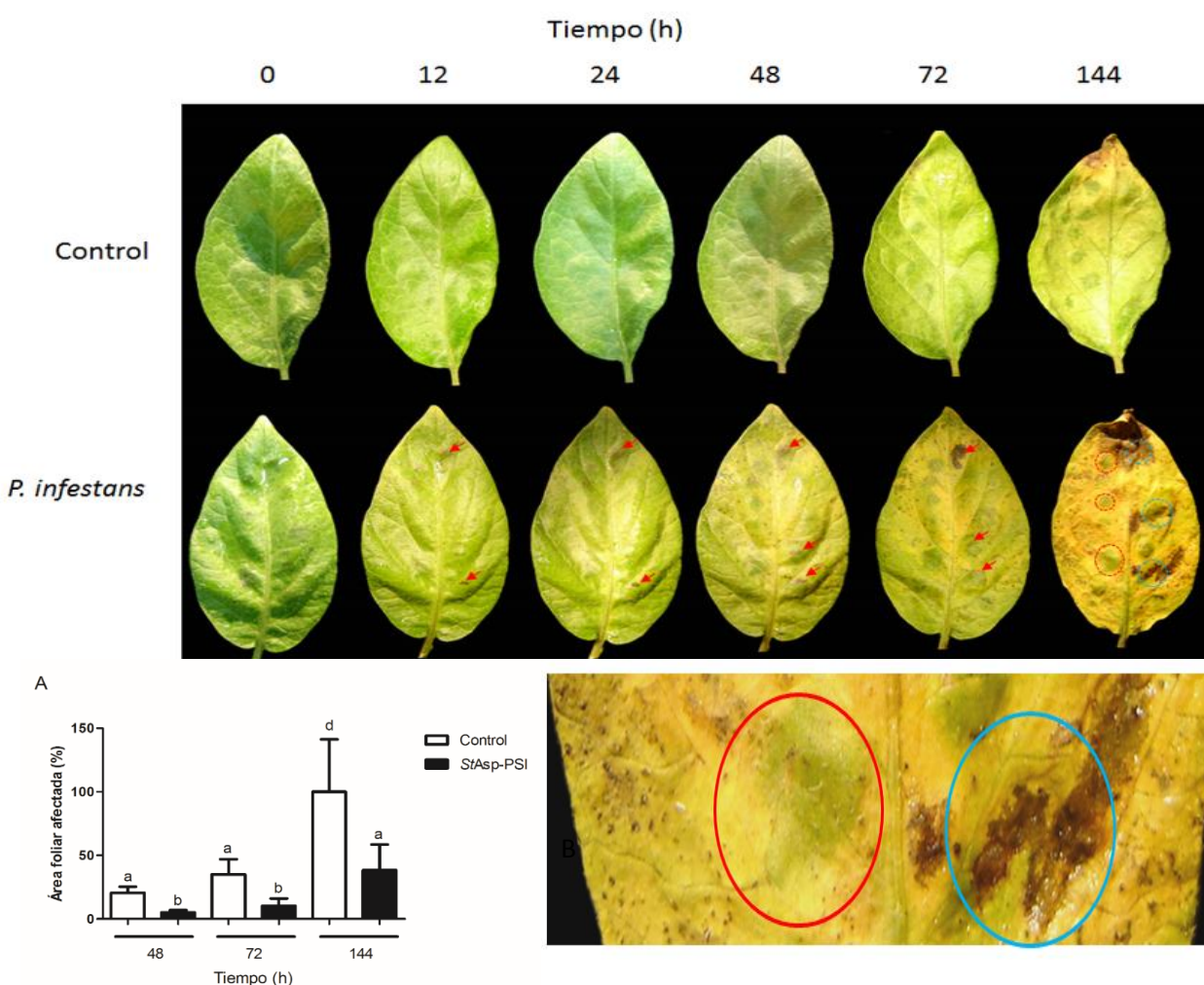
## **RESULTADOS**

**Transformación transitoria de hojas de papa con la construcción pCHF3-péptido señal-StAsp-PSI.** Mediante la realización de este trabajo se logró obtener la construcción de un ADNc denominado como péptido señal-StAps-PSI de un peso estimado de 519 pb. Este ADNc está compuesto por una secuencia correspondiente a la región del péptido señal del ADNc *StAsp-1* (*GenBank accession number* AY672651) ligada a la secuencia nucleotídica correspondiente al dominio PSI del mismo ADNc (María G. Guevara et al., 2005) (Figura 1, Materiales y Métodos). Se obtuvo posteriormente un cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un vector binario



con la construcción péptido señal-StAps-PSI. Este cultivo fue utilizado para infiltrar hojas de un cultivar de papa susceptible en el campo a *P. infestans* (cv. *Bintje*) con el objetivo de determinar si, al igual que la proteína recombinante StAps-PSI, la expresión transitoria del ADNc péptido señal-StAps-PSI produce una disminución del área foliar afectada por la infección con *P. infestans*.

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del ADNc péptido señal-StAps-PSI produjo una disminución significativa del 60.5% del área foliar afectada por la infección de *P. infestans* a las 144 h, comparada con la superficie afectada en las



**Figura 1. Avance de *P. infestans* en hojas de papa del cultivar *Bintje* agroinfiltradas con construcción péptido señal-StAps-PSI. (A) Área foliar afectada por *P. infestans* luego de 48, 72 y 144 horas luego de la infección. (B) del área foliar afectada por *P. infestans* luego de 144 h post-infección en hojas agroinfiltradas con medio de infiltración (control; círculo azul) o con la construcción péptido señal-StAps-PSI (círculo rojo).**

hojas infiltradas con medio de cultivo conteniendo bacterias sin transformar (Figura 1). Este resultado es consistente al obtenido al infiltrar hojas del mismo cultivar con la proteína *StAsp-PSI* en donde se observó una disminución del 50% del área foliar afectada por *P. infestans* a las 120 h (Muñoz, 2012).

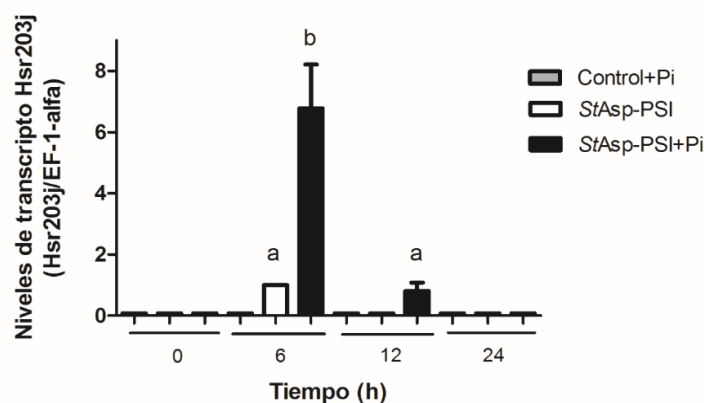
**Efecto de *StAsp-PSI* sobre la expresión de genes de defensa de *Solanum tuberosum*.** Con el objetivo de analizar el efecto de la expresión del dominio *StAsp-PSI* sobre los niveles de transcritos de genes involucrados en la respuesta de defensa, se procedió a agroinfiltrar hojas de papa con la construcción péptido señal-*StAsp-PSI* o con medio de infiltración conteniendo bacterias sin transformar (control). Para ello, se extrajo el ARN total de hojas tratadas con agua (control) o *P. infestans* por 0, 6, 12 y 24 h, se procedió a la síntesis de ADNc y posteriormente se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como se detalló en Materiales y Métodos.

Los genes analizados fueron: 1- el gen del factor de elongación-1- alfa (*EF-1 $\alpha$* ; *GenBank accession number* AB0611263), como control endógeno de expresión constitutiva, debido a que su expresión es la más estable durante la interacción papa- *P. infestans* (Nicot, Hausman, Hoffmann, & Evers, 2005). El gen presentó una única curva de desnaturalización indicando un único producto de amplificación con una eficiencia del 100.745% para el gen *EF-1 $\alpha$*  según lo obtenido por Fernández (2015).

2- El gen *hsr203J* (*GenBank accession number* AB200918.1), el cual es uno de los genes de defensa utilizado como marcador de la respuesta hipersensible, cuyo transcrito se acumula en hojas y raíces de *N. tabacum* infectadas con la bacteria *Pseudomonas solanacearum* entre las 3 y 6 h posteriores a la infección (Pontier, Godiard, Marco, & Roby, 1994). Particularmente durante la interacción papa- *P. infestans*, se ha reportado un incremento en los niveles de ARNm del gen *hsr203J* en hojas infectadas con dicho patógeno durante 48 h (Yamamizo, Kuchimura, Kobayashi, Katou, & Kawakita, 2006). Los resultados obtenidos muestran que el gen presenta una única curva de desnaturalización indicando un único producto de

amplificación con una eficiencia del 90.792% para el gen *hsr203J* y del 100.745% para el gen *EF-1α* según lo obtenido por Fernández (Fernández, 2015).

Adicionalmente se pudo determinar que la expresión de *StAsp-PSI* en hojas de papa produce la inducción del gen relacionado con la respuesta hipersensible *hsr203J* independientemente de la infección, observándose un mayor nivel de inducción de transcritos del marcador de la respuesta hipersensible *hsr203J* a las 6 h en presencia del patógeno respecto del control (Figura 2). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Muñoz (2012) los cuales mostraron un incremento en los niveles de transcritos de genes relacionados con la HR en hojas de papa del cultivar *Bintje* infiltradas con la proteína recombinante *StAsp-PSI* a los mismos tiempos de tratamiento.



**Figura 2.** Expresión del gen *hsr203J* en hojas de papa agroinfiltradas con *StAsp-PSI* luego de 0, 6, 12 y 24 h post-infección con *P. infestans*. Los resultados se relativizaron a la expresión del gen *EF-1-α*, se expresaron como la diferencia entre las hojas agroinfiltradas con la construcción péptido señal-*StAsp-PSI* y el control para cada tiempo y se relativizaron a la media de la muestra agroinfiltrada con la construcción péptido señal-*StAsp-PSI* sin infectar por 6 h. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS de al menos dos experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey ( $p < 0.001$ ).

3- El gen WRKY pertenece a una familia de factores de transcripción la cual, es una de las familias de reguladores transcripcionales más numerosa en plantas (Rushton, Somssich, Ringler, & Shen, 2010). Se ha reportado que en la respuesta a la infección

por patógenos, se produce un aumento en la expresión del factor de transcripción WRKY1 (*GenBank accession number* AY615273.1) (Dellagi et al., 2000; Eulgem, Rushton, Schmelzer, Hahlbrock, & Somssich, 1999; Wang, Liu, Tian, Song, & Xie, 2005), el cual se une a la caja de promotores de genes de defensa, tales como PR1, e induce la expresión de los mismos (Eulgem et al., 1999). Con el objetivo de evaluar el efecto de la expresión de StAsp-PSI sobre la expresión del gen de defensa WRKY1 en hojas de papa, se analizaron los niveles de transcritos en hojas de papa control o agroinfiltradas con la construcción péptido señal-StAsp-PSI mediante qRT-PCR. El análisis de la especificidad de la reacción de qRT-PCR mostró una única curva de desnaturalización para el gen WRKY1, indicando la presencia de un único producto de amplificación y la eficiencia de la reacción fue del 85.758%. Los resultados obtenidos mostraron que la construcción péptido señal-StAsp-PSI produce un aumento significativo en los niveles de transcritos WRKY a las 12 h de infección con *P. infestans*, no así en los controles sin infectar e infectado y agroinfiltrado solo con medio conteniendo bacterias sin transformar (datos no mostrados). Por el contrario, a los demás tiempos analizados, no se detectaron niveles de transcripto para este gen (datos no mostrados). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Muñoz (2012) los cuales mostraron la inducción de genes relacionados con SAR en hojas infiltradas con la proteína StAps-PSI posteriormente a la infección con *P. infestans*.

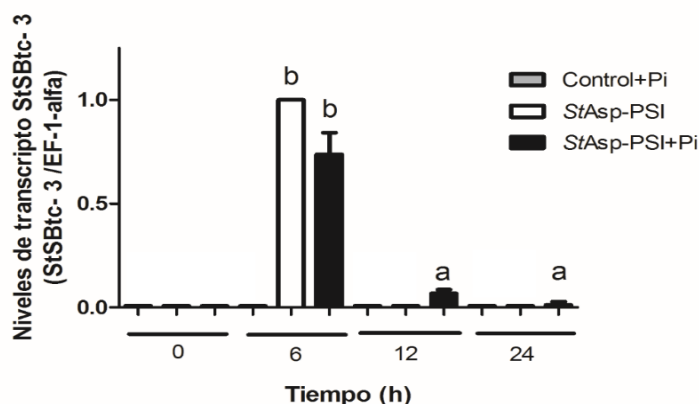
4- En cuanto al mecanismo por el cual el dominio StAsp-PSI podría inducir genes relacionados con la respuesta hipersensible, cabe destacar que el mismo posee una alta similitud estructural con dos proteínas del tipo saposinas (SAPLIPs), la NK-lisina y la granulisina (María G. Guevara et al., 2005; Muñoz et al., 2010). La granulisina es una molécula antimicrobiana y tumoricida expresada en gránulos de células CTL y NK de mamíferos. En un estudio realizado por Kaspar & col., (2001), se ha demostrado que la granulisina desestabiliza la integridad de las membranas celulares cargadas negativamente y de esta manera, mediante la generación de un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , cambiando el potencial transmembrana en las mitocondrias y finalmente causando la liberación de citocromo c de las mismas. Se ha observado que además durante este proceso la activación de la caspasa 3, la cual es independiente de la

activación de la procaspasa 9, lo que sugiere que la granulicina activa otra vía de apoptosis de células CTL y NK diferente de la vía apoptótica clásica mediada por receptor (Kaspar et al., 2001; Ma & Mody, 2005).

Por otra parte si bien, no existen genes homólogos a los de las caspasas animales en los genomas secuenciados de plantas, se han determinado actividades del tipo caspasa en varios sistemas experimentales (Bonneau, Ge, Drury, & Gallois, 2008). Específicamente en lo que respecta a la actividad de caspasa-3, en nuestro laboratorio (Fernández, Daleo, & Guevara, 2012, 2015) han reportado la presencia e inducción de la actividad de una proteasa del tipo subtilisina, extracelular con actividad de caspasa-3 (*StSBTc-3*) en el apoplasto de hojas de planta de papa durante la interacción papa- *P. infestans*. En dicho trabajo se demostró una correlación positiva entre el nivel de expresión de *StSBTc-3* y el grado de resistencia a campo a *P. infestans*. Se observó además que al igual que la caspasa-3 de animales, la *StSBTc-3* es capaz de inducir *in vitro* la muerte celular de las plantas (Fernández et al., 2012, 2015).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de determinar si el dominio *StAsp-PSI* presenta en plantas, un mecanismo de acción similar al reportado para la granulicina en animales, se analizó el nivel de transcritos del gen *StSBTc-3* (*GenBank accession number* PGSC0003DMP 400018521) en hojas transformadas con la construcción péptido señal-*StAsp-PSI* y posteriormente inoculadas con agua o *P. infestans*.

Los resultados obtenidos indican un incremento significativo en los niveles de ARNm de este gen a las 6 h en presencia del dominio *StAsp-PSI* independientemente de la infección con *P. infestans*, mientras que a las 12 y 24 h se puede observar una disminución en los niveles de transcritos para este gen (Figura 3).



**Figura 3.** Expresión del gen *StSBtc-3* en hojas de plantas de papa agroinfiltradas con *StAsp-PSI* a las 0, 6, 12 y 24 h post-infección con *P. infestans*. Los resultados se relativizaron únicamente a la expresión del gen *EF-1-α*, y se expresaron como la diferencia entre las hojas agroinfiltradas con la construcción péptido señal-*StAsp-PSI* y el control para cada una. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS de al menos dos experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey ( $p < 0.001$ ).

De esta manera se podría sugerir, al igual que lo descrito por Kaspar et al. (2001), para la granulisina en células de mamíferos, que la expresión de *StAsp-PSI* en hojas de plantas de papa inducen el mecanismo de muerte celular mediado por la activación de la caspasa-3. Sin embargo serán necesarios nuevos ensayos que permitan analizar otros parámetros como por ejemplo la viabilidad mitocondrial, los cuales permitan corroborar esta hipótesis.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el dominio *StAsp-PSI* expresado de manera transitoria en hojas de plantas de papa incrementa la expresión de genes relacionados con la defensa en plantas, lo cual desencadena en la disminución del área foliar infectada por *P. infestans*. Estos resultados permiten sugerir el potencial uso de este ADNc como herramienta biotecnológica para incrementar la resistencia a patógenos de los cultivos.

## LITERATURA CITADA

- Alam, M., Nakamura, H., Ichikawa, H., Miyao, A., Hirochika, H., Kobayashi, K., ... Nishiguchi, M. (2014). Response of an aspartic protease gene OsAP77 to fungal, bacterial and viral infections in rice. *Rice*, 7(1), 9. doi:10.1186/s12284-014-0009-2
- Alan J. Barrett, J. Fred Woessner, N. D. R. (2012). Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In *Handbook of Proteolytic Enzymes, Volumen 1* (Second edi, p. 984). Elsevier.
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G. E., & Gallois, P. (2008). What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 491–499. doi:10.1093/jxb/erm352
- Chen, F., & Foolad, M. R. (1997). Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Molecular Biology*, 35(6), 821–831. doi:10.1023/A:1005833207707
- Cruz de Carvalho, M. H., D'Arcy-Lameta, A., Roy-Macauley, H., Gareil, M., El Maarouf, H., Pham-Thi, A. T., & Zuily-Fodil, Y. (2001). Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): Enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letters*, 492(3), 242–246. doi:10.1016/S0014-5793(01)02259-1
- Davies, D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 19, 189–215. doi:10.1146/annurev.biophys.19.1.189
- Dellagi, a, Helibronn, J., Avrova, a O., Montesano, M., Palva, E. T., Stewart, H. E., ... Birch, P. R. (2000). A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 13(10), 1092–1101. doi:10.1094/MPMI.2000.13.10.1092
- Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the Pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*, 102(12), 4431–4458. doi:10.1021/cr010167q
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., & Somssich, I. E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO Journal*, 18(17), 4689–4699. doi:10.1093/emboj/18.17.4689
- Faro, C., & Gal, S. (2005). Aspartic proteinase content of the Arabidopsis genome. *Current Protein & Peptide Science*, 6(6), 493–500. doi:10.2174/138920305774933268
- Fernández, M. B. (2015). *Rol de proteasas tipo caspasas en la respuesta de defensa de Solanum tuberosum a la infección por Phytophthora infestans*. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Fernández, M. B., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2012). DEVDase activity is induced in potato leaves during *Phytophthora infestans* infection. *Plant*

- Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 61, 197–203. doi:10.1016/j.plaphy.2012.10.007
- Fernández, M. B., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (StSBTc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 137–146. doi:10.1016/j.plaphy.2014.12.001
- Fujikura, Y., & Karssen, C. M. (1995). Molecular studies on osmoprimed seeds of cauliflower: a partial amino acid sequence of a vigour-related protein and osmopriming-enhanced expression of putative aspartic protease. *Seed Science Research*, 5(03), 177–181. doi:10.1017/S0960258500002804
- García-Lorenzo, M., Sjödin, A., Jansson, S., & Funk, C. (2006). Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 6, 30. doi:10.1186/1471-2229-6-30
- Guevara, M. G., Almeida, C., Mendieta, J. R., Faro, C. J., Veríssimo, P., Pires, E. V., & Daleo, G. R. (2005). Molecular cloning of a potato leaf cDNA encoding an aspartic protease (StAsp) and its expression after *P. infestans* infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(9), 882–889. doi:10.1016/j.plaphy.2005.07.004
- Guevara, M. G., Oliva, C. R., Huarte, M., & Daleo, G. R. (2002). An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 108(2), 131–137. doi:10.1023/A:1015049629736
- Guevara, M. G., Veríssimo, P., Pires, E., Faro, C., & Daleo, G. R. (2004). Potato aspartic proteases: Induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *Journal of Plant Pathology*, 86(3), 233–238.
- Guo, R., Zhao, J., Wang, X., Guo, C., Li, Z., Wang, Y., & Wang, X. (2014). Constitutive expression of a grape aspartic protease gene in transgenic *Arabidopsis* confers osmotic stress tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(2), 275–287. doi:10.1007/s11240-014-0699-6
- Kaspar, a a, Okada, S., Kumar, J., Poulain, F. R., Drouvalakis, K. a, Kelekar, a, ... Krensky, a M. (2001). A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(1), 350–356. doi:10.4049/jimmunol.167.1.350
- Ma, L. L., & Mody, C. H. (2005). Granulysin and Direct Lymphocyte-Mediated Antimicrobial and Antitumor Activity, (25), 18–20.
- Mendieta, J. R., Pagano, M. R., Muñoz, F. F., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 152(7), 2039–2047. doi:10.1099/mic.0.28816-0
- Muñoz, F. F. (2012). *Estudio del mecanismo de interacción con membranas de la proteína StAsp-PSI (Solanum tuberosum Aspartic protease-Plant Specific Insert)*. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Muñoz, F. F., Mendieta, J. R., Pagano, M. R., Paggi, R. a., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2010). The swaposin-like domain of potato aspartic protease (StAsp-PSI) exerts antimicrobial activity on plant and human pathogens. *Peptides*, 31(5), 777–785. doi:10.1016/j.peptides.2010.02.001
- Mutlu, A., Chen, X., Reddy, S. M., & Gal, S. (1999). The aspartic proteinase is expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds and localized in the protein bodies. *Seed Science Research*, 9(1), 75–84. doi:10.1017/S0960258599000082



- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2907–2914. doi:10.1093/jxb/eri285
- Pieterse, C. M., Derksen, a M., Folders, J., & Govers, F. (1994). Expression of the *Phytophthora infestans* ipiB and ipiO genes in planta and in vitro. *Molecular & General Genetics : MGG*, 244(3), 269–277. doi:10.1007/BF00285454
- Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y., & Roby, D. (1994). hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 5(4), 507–521. doi:10.1046/j.1365-313X.1994.05040507.x
- Prasad, B. D., Creissen, G., Lamb, C., & Chattoo, B. B. (2009). Overexpression of rice (*Oryza sativa* L.) OsCDR1 leads to constitutive activation of defense responses in rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 22(12), 1635–1644. doi:10.1094/MPMI-22-12-1635
- Prasad, B. D., Creissen, G., Lamb, C., & Chattoo, B. B. (2010). Heterologous expression and characterization of recombinant OsCDR1, a rice aspartic proteinase involved in disease resistance. *Protein Expression and Purification*, 72(2), 169–174. doi:10.1016/j.pep.2010.03.018
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1999). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 325–331. doi:10.1093/nar/27.1.325
- Rodrigo, I., Vera, P., Van Loon, L. C., & Conejero, V. (1991). Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins: evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Physiology*, 95(2), 616–622. doi:10.1104/pp.95.2.616
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247–258. doi:10.1016/j.tplants.2010.02.006
- Simões, I., & Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 271(11), 2067–2075. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04136.x
- Wang, B., Liu, J., Tian, Z., Song, B., & Xie, C. (2005). Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays. *Plant Science*, 169(6), 1155–1167. doi:10.1016/j.plantsci.2005.07.020
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., ... Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal*, 23(4), 980–988. doi:10.1038/sj.emboj.7600086
- Yamamizo, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., & Kawakita, K. (2006). Rewiring Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade by Positive Feedback Confers Potato Blight Resistance 1, 140(February), 681–692. doi:10.1104/pp.105.074906.)
- Yao, X., Xiong, W., Ye, T., & Wu, Y. (2012). Overexpression of the aspartic protease ASPG1 gene confers drought avoidance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2579–2593. doi:10.1093/jxb/err433